

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления иммуноглобулинов класса G к отдельным антигенам возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* методом иммунного блоттинга с применением рекомбинантных полипептидов «ТрепонемаБлот»

ФСР 2010/08586

Е-0411 **ТрепонемаБлот**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ТрепонемаБлот», далее по тексту – набор, предназначен для подтверждения в образцах сыворотки (плазмы) крови или ликвора человека наличия антител IgG к отдельным антигенам возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* методом линейного иммуноблоттинга.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

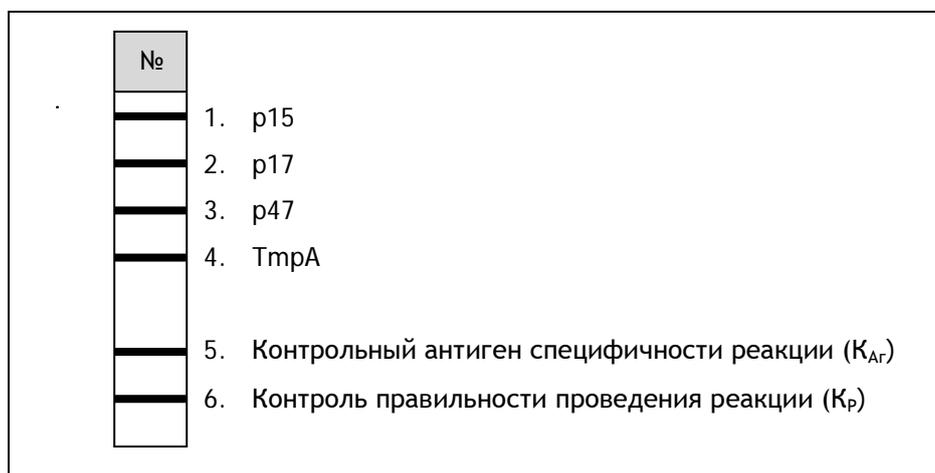
На поверхности иммуносорбента - полосок нитроцеллюлозной мембраны - в виде поперечных линий иммобилизованы очищенные рекомбинантные антигены - аналоги липопротеидов оболочки *Treponema pallidum*, контрольный антиген и контроль правильности проведения реакции:

- рекомбинантные антигены «p15», «p17», «TmpA» и «p47» (линии №№ 1-4 на рис.1) представляют собой синтезированные в *E.coli* полипептиды, которые содержат аминокислотную последовательность протективного белка (β -галактозидазы *E.coli*) и антигенные детерминанты липопротеидов оболочки *Treponema pallidum* p15, p17, TmpA, p47;

- контрольный антиген специфичности реакции (K_{Ag}) (линия № 5 на рис.1) представляет собой синтезированный в *E.coli* рекомбинантный полипептид, содержащий ту же аминокислотную последовательность протективного белка и не содержащий антигенных детерминант *Treponema pallidum*.

- контроль правильности проведения реакции (K_p) (линия № 6 на рис.1) представляет собой иммунную сыворотку животных против IgG человека;

Рис 1. Размещение линий с иммобилизованными специфическими и контрольным антигенами, контролем правильности проведения реакции на полоске нитроцеллюлозной мембраны.



Положительный контрольный образец инактивированный K^+ представляет собой сыворотку крови человека, содержащую антитела к белкам возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* и не содержащая антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена p24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирована прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Отрицательный контрольный образец инактивированный K^- представляет собой сыворотку крови человека, не содержащую антител к белкам возбудителя

сифилиса *Treponema pallidum*, к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1 и HBsAg. Инактивирована прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч.

Конъюгат представляет собой моноклональные антитела мыши против IgG человека, связанные с ферментом пероксидазой хрена.

Раствор № 4 для разведения хромогена содержит субстрат ферментативной реакции.

Хромогеном является 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Анализируемые образцы инкубируют с иммуносорбентом в желобках планшетов для проведения реакции. Трепонемоспецифические иммуноглобулины класса G, содержащиеся в анализируемых образцах, связываются с соответствующими рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum* на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело, и не взаимодействуют с K_{Ag} ; при этом неспецифические иммуноглобулины связываются с присутствующими в K_p антителами против иммуноглобулинов класса G человека. После удаления несвязанных антител в канавки планшетов с мембранами добавляют конъюгат, который взаимодействует с иммунными комплексами, образовавшимися на предыдущем этапе реакции. После удаления несвязанных молекул конъюгата, мембраны выдерживают с индикаторным раствором, включающим субстрат и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Содержащийся в конъюгате фермент катализирует разложение субстрата, что приводит к окрашиванию участков иммуносорбента (линии №№ 1-4), на которых иммобилизованы рекомбинантные антигены «p15», «p17», «TmprA» и «p47» и K_p (линия № 6), в фиолетово-синий цвет. Линия № 5, соответствующая K_{Ag} , остается неокрашенной. После остановки реакции результаты учитывают визуально по появлению окрашенных линий на полосках иммуносорбента.

2.2. Состав набора

Набор выпускается в виде реагентов, упакованных в коробку:

Компонент набора	Описание	Количество
Имуносорбент	Полоски нитроцеллюлозной мембраны белого цвета размером 40 мм × 4 мм, маркированные по верхнему краю цифрами, с выпуклыми поперечными линиями, на которых иммобилизованы антигены.	24 мембраны 1 пробирка
Положительный контрольный образец инактивированный K^+	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	0,25 мл 1 пробирка
Отрицательный контрольный образец инактивированный K^-	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета.	0,25 мл 1 пробирка
Конъюгат	Прозрачная жидкость светло-желтого цвета.	от 0,5 до 2,0 мл 1 пробирка

Концентрат раствора № 2 блокирующего	Пенящаяся опалесцирующая бесцветная жидкость; при хранении возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	31 мл 1 флакон
Раствор № 3 для разведения сывороток	Пенящаяся опалесцирующая бесцветная жидкость, при хранении возможно выпадение рыхлого комкующегося осадка разной интенсивности, легко разбивающегося при встряхивании.	25 мл 1 флакон
Раствор № 4 для разведения хромогена	Прозрачная бесцветная жидкость.	30 мл 1 флакон
Хромоген	Прозрачная бесцветная жидкость.	1,0 мл 1 пробирка
Раствор № 6 для остановки реакции	Прозрачная бесцветная жидкость.	25 мл 1 флакон
Планшет для проведения реакции	Пластмассовый планшет с 12-или 8-канавками соответственно.	2 шт с 12 канавками или 3 шт. с 8 канавками

Набор рассчитан на проведение 24 анализов, включая контрольные.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Со всеми тестируемыми образцами, отработанными растворами, а также с находящимися с ними в контакте оборудованием и материалами следует обращаться как с потенциально инфицированными объектами:

- не пипетировать растворы ртом, при работе использовать индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки и защитные очки);
- все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности (например, в течение 16-18 часов в растворе гипохлорита натрия в конечной концентрации 1%);
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при 121°C или сжигать;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта;
- утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- орбитальное качающее устройство или качающее устройство (например, КУ-400, «ИММЕДТЕХ», Московская обл., г. Дубна);
- аспиратор вакуумный;
- дистиллятор;

- пинцет пластмассовый;
- пипетки автоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- цилиндры мерные вместимостью 10 мл и 200 мл;
- стаканы мерные вместимостью 10 мл и 200 мл;
- перчатки резиновые хирургические;
- 70% раствор спирта этилового;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- флаконы стеклянные вместимостью 20 мл;
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- одноразовая посуда для приготовления рабочих растворов конъюгата и хромогена.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы крови человека в объеме 20 мкл, образцы ликвора в объеме 50 мкл.

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием. Собранные образцы сыворотки/плазмы и ликвора хранить при температуре от 4°C до 6°C. Если образцы невозможно протестировать в течение 72 ч, то их следует хранить при температуре не выше минус 15°C. Замороженные образцы сывороток можно хранить до 1 года. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

Каждый исследуемый образец или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

ВНИМАНИЕ!

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

Анализ проб следует проводить так, чтобы на одного оператора одновременно приходилось не более одного набора.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследование образцов можно проводить по одной из двух описанных ниже схем: с 2- или 18-часовой инкубацией. По последней схеме рекомендуется проводить исследования образцов, если о них заранее известно, что они являются слабоположительными.

6.1. Приготовление реагентов (для проведения 8 анализов)

Перед началом работы используемые компоненты набора выдержать при комнатной температуре 30 мин. После вскрытия индивидуальной упаковки неиспользованные компоненты хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 8 недель. Канавки планшета для проведения реакции рекомендуется протереть салфеткой, смоченной 70% раствором этилового спирта и ополоснуть дистиллированной водой.

Растворы № 3, № 6, K^+ и K^- готовы к применению. Флакон с раствором № 3 перед использованием обязательно интенсивно встряхнуть.

6.1.1. Приготовление рабочего раствора № 2

Флакон с концентратом раствора № 2 интенсивно встряхнуть до полного растворения комкующегося осадка. 10 мл концентрата раствора № 2 перенести в мерную емкость, довести объем до метки 80 мл дистиллированной водой и перемешать.

Готовый раствор хранить не более 4 ч при температуре от 18 до 25°C или 24 ч при температуре от 4 до 12°C.

6.1.2. Приготовление рабочего разведения конъюгата

Указанные в данном пункте объемы конъюгата относятся к наборам серии №21.

Отобрать 0,2 мл конъюгата в случае выдерживания образцов в течение 2 ч, либо 0,1 мл конъюгата в случае выдерживания образцов в течение 18 ч, поместить в чистую посуду и добавить 9 мл рабочего раствора № 2 (см. п. 6.1.1). Тщательно перемешать, не допуская образования пены.

Готовый раствор конъюгата хранить не более 15 мин при температуре от 9 до 25°C в защищенном от света месте.

6.1.3. Приготовление индикаторного раствора

Отобрать 9 мл раствора № 4, поместить в чистую емкость и добавить 0,2 мл хромогена. Тщательно перемешать.

Готовый раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с хромогеном, раствором № 4 и индикаторным раствором, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы приводят к неконтролируемому разложению хромогена в ходе пероксидазной реакции.

6.2. Проведение линейного иммуноблоттинга

Все операции с полосками нитроцеллюлозных мембран следует проводить с использованием пластмассового пинцета.

Обратить внимание, чтобы при инкубации и промывании полоски мембран были полностью погружены в жидкость, а реагенты не переливались через бортики канавок во избежание смешивания. После окончания отдельных стадий реакции и промывок все растворы необходимо тщательно удалять при помощи вакуумного аспиратора или автоматической пипетки. Следить, чтобы капли влаги не оставались под мембраной. При необходимости осторожно приподнять мембрану пинцетом и удалить из-под нее остатки влаги.

Обратить внимание, чтобы растворы не попадали внутрь пипетки.

Процедура проведения анализа с 2-часовой инкубацией

6.2.1 Необходимое количество полосок мембран извлечь из пробирки и поместить по одной в каждую канавку планшета. Внести в каждую канавку по 1 мл раствора № 3 так, чтобы мембраны погрузились в раствор. Поместить планшет на качающее устройство и выдержать 10 мин при температуре от 20 до 25 °С в таком режиме перемешивания, чтобы полоски мембран были полностью погружены в жидкость, а реагенты не переливались через бортики канавок во избежание смешивания. Например, при использовании орбитально качающего устройства это достигается при частоте вращения 160 об/мин и амплитуде кругового движения не менее 13 мм или частоте 90 об/мин и амплитуде не более 80 мм.

6.2.2. Снять планшет с качающего устройства. Не удаляя раствора № 3, внести в две канавки планшета по 20 мкл K^+ и K^- , в остальные канавки по 20 мкл испытуемых образцов сывороток или 50 мкл образцов ликвора. При внесении каждого (исследуемого и контрольного) образца необходимо регистрировать номер соответствующей ему мембраны.

Каждую пробу вносить в соответствующую канавку планшета новым наконечником. Внесение образцов должно сопровождаться быстрым и тщательным перемешиванием автоматической пипеткой.

Заклеить занятые канавки липкой пленкой и поместить планшет с мембранами на платформу качающего устройства. Выдержать 2 ч при температуре от 20 до 25 °С, покачивая планшет, как описано в п.6.2.1.

6.2.3. Удалить жидкость из канавок планшета (с этой целью здесь и далее использовать лабораторный вакуумный аспиратор или автоматическую пипетку). Внести в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2, после чего раствор сразу удалить.

6.2.4. Внести в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2, выдержать 5 мин, покачивая планшет (см. п. 6.2.1.), раствор удалить. Операцию повторить.

6.2.5. Внести в каждую канавку по 1 мл рабочего разведения конъюгата. Выдержать 1 час при температуре от 20 °С до 25 °С, покачивая планшет, как описано в п. 6.2.1.

6.2.6. Раствор конъюгата удалить. Внести в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2 (см. п. 6.1.1.), раствор сразу удалить.

ВНИМАНИЕ!

Промывки и удаление жидкости после реакции с конъюгатом требуют особого внимания, так как следы конъюгата при контакте с субстратом могут привести к неспецифическому окрашиванию всей мембраны, а не отдельных линий.

6.2.7. Внести в каждую канавку по 1 мл рабочего раствора № 2, выдержать 5 мин, покачивая планшет (см. п. 6.2.1.), жидкость удалить. Операцию повторить.

6.2.8. Быстро промыть мембраны дистиллированной водой, поочередно добавляя в каждую канавку по 1 мл и сразу же ее удаляя.

6.2.9. Внести в каждую канавку по 1 мл свежеприготовленного индикаторного раствора (см. п. 6.1.4.). Выдержать, покачивая планшет (см. п. 6.2.1.), 15 минут

при температуре от 20 до 25°С в защищенном от света месте, например, во избежание попадания света планшет накрыть непрозрачной крышкой.

6.2.10. Жидкость удалить. Внести в каждую канавку по 1 мл раствора № 6, выдержать 5 мин, покачивая планшет (см. п. 6.2.1.). Раствор удалить. Дважды тщательно промыть мембраны дистиллированной водой объемом не менее 2 мл.

6.2.11. Положить полоски мембран на лист фильтровальной бумаги и, не промокая их, поместить в защищенное от света место до полного высыхания. Для удобства учета результатов можно зафиксировать полоски мембран на листе писчей бумаги с помощью липкой ленты.

ВНИМАНИЕ! Не приклеивать липкую ленту к участкам мембраны с иммобилизованными антигенами.

6.2.12. Процедура проведения анализа с 18-часовой инкубацией

В этом более чувствительном варианте исследования нужно изменить только следующие параметры проведения реакции:

а) исследуемые и контрольные образцы вносить так же, как описано в п. 6.2.2., но увеличить длительность инкубации до 18-20 часов;

б) вносить в каждую канавку по 1 мл рабочего разведения конъюгата, предписанного для 18-часовой инкубации с образцами (см. п. 6.1.2.). Выдерживать 30 минут при температуре от 20 до 25°С, покачивая планшет, как описано в п. 6.2.1.

7. РЕГИСТРАЦИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов осуществлять визуально по окрашиванию участков мембран с иммобилизованными трепонемоспецифическими, контрольным антигеном и контролем правильности проведения реакции сразу же после полного высыхания мембран.

Регистрации подлежит окрашивание любой интенсивности.

7.1. Учет результатов исследования образцов проводить при соблюдении следующих условий:

а) появление фиолетово-синего окрашивания в области линий на полосках мембран (рис. 1) при исследовании контрольных образцов строго в соответствии с Таблицей 2.

Таблица 2. Окрашивание линий на полосках мембран при анализе контрольных образцов (K⁺ и K⁻).

№ линии	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Наименование антигена	p15	p17	p47	ТmpA	K _{Ag}	K _p
K ⁻	нет	нет	нет	нет	нет	есть
K ⁺	есть	есть	есть	есть	нет	есть

б) появление четкого фиолетово-синего окрашивания на полоске мембраны в области линии № 6 (K_p: контроль правильности проведения реакции) при исследовании всех образцов, что свидетельствует о внесении тестируемого образца в данную лунку.

При получении иных результатов исследование считать выполненным некорректно и его следует повторить.

7.2. Линия № 5 (K_{Ag}: контрольный антиген специфичности реакции) при исследовании образцов должна быть не окрашена. При анализе некоторых образцов возможно появление слабого окрашивания линии № 5. В этом случае интенсивность окрашивания линий №№ 1-4, содержащих трепонемоспецифические антигены, необходимо сравнить с интенсивностью окрашивания линии № 5.

Окрашивание каждой из линий №№ 1-4 следует учитывать как **достоверно специфическое** в случае превышения его интенсивности по сравнению с окрашиванием линии № 5.

Одинаковое по интенсивности окрашивание каждой из линий №№ 1-4 и линии № 5 следует рассматривать как неспецифическое.

7.3. Результат исследования образца считать:

положительным, если произошло достоверно специфическое окрашивание двух или более линий мембраны с трепонемоспецифическими антигенами (№№ 1-4);

неопределенным, если произошло достоверно специфическое окрашивание не более одной из линий №№ 1-4;

отрицательным, если не произошло достоверно специфического окрашивания ни одной из линий №№ 1-4.

7.4. При получении неопределенного результата исследования образца рекомендуется повторное взятие крови через 3-4 недели и новое тестирование на появление антител к антигенам *Treponema pallidum*. При повторном получении неопределенного результата образец рекомендуется исследовать дополнительно другими методами.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор транспортируют и хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8°C. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование в течение 3 суток при температуре от 9 до 30°C.

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемиологических учреждениях.

Срок годности набора - 12 месяцев. Применение набора и реагентов после окончания срока годности не допускается.

ДЛЯ ЗАМЕТОК